



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 196 49 207 C 1

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 07 K 14/025
C 12 N 15/37
C 07 H 21/04
C 07 K 16/08
C 12 Q 1/68
A 61 K 48/00
G 01 N 33/574
A 61 K 39/42

②1 Aktenzeichen: 196 49 207.6-41
②2 Anmeldetag: 27. 11. 96
④3 Offenlegungstag: —
④5 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 26. 2. 98

DE 196 49 207 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦4 Vertreter:

Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑦2 Erfinder:

Dürst, Matthias, Dipl.-Biol. Dr., 69120 Heidelberg,
DE; Nees, Matthias, Dipl.-Biol., 69214 Eppelheim, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

Oncogene 1, S.251-256, 1987;

⑤4 DNA, Polypeptid und Antikörper zur Abschätzung des Progressionspotentials von Zervixläsionen

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die geeignet ist zur Abschätzung des Progressionspotentials von Zervixläsionen, wobei die Nukleinsäure durch ein Verfahren erhältlich ist, bei dem man RNA aus frühen und späten Passagen HPV-immortalisierter Zellen isoliert und von dieser RNA jene identifiziert und als DNA oder RNA bereitstellt, die für die frühen bzw. späten Passagen charakteristisch ist. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung durch eine solche Nukleinsäure codierte Polypeptide. Des weiteren betrifft sie Antikörper, die gegen die Polypeptide gerichtet sind. Darüber hinaus betrifft sie die Verwendung der DNA und der Polypeptide sowie einen zur Abschätzung der Progression von Zervixläsionen geeigneten Kit.

DE 196 49 207 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft DNA, die sich zur Abschätzung des Progressionspotentials von Zervixläsionen eignet, und durch solche DNA codierte Polypeptide. Ferner betrifft die Erfindung Antikörper, die gegen die Polypeptide gerichtet sind. Desweiteren betrifft sie die Verwendung der DNA und der Polypeptide sowie die Verwendung dieser zur Abschätzung der Progression von Zervixläsionen in Form eines geeigneten Kit.

Das invasive Zervixkarzinom geht in der Regel aus einer Präkanzerose hervor. Präkanzerosen umfassen ein breites Spektrum von Läsionen, die histopathologisch als leichte bis schwere Dysplasie (CIN1 bis CIN3) bezeichnet werden. CIN1-Läsionen bilden sich häufig spontan zurück und müssen in der Regel nicht therapiert werden. Andererseits können diese Läsionen über Jahre persistieren oder in eine höhergradige Läsion übergehen, z. B. CIN3 oder in ein mikroinvasives Karzinom. Zur Diagnose von Zervixabstrichen wird seit rund 50 Jahren ein zytologisches Verfahren angewendet, mit welchem dysplastische Zellen in Zervixabstrichen nachgewiesen werden können. Allgemein bekannt ist dieses Verfahren unter dem Begriff "Pap-Test". Der "Pap-Test" hat dazu beigetragen, daß die Inzidenz des Zervixkarzinoms in der Vergangenheit signifikant gesenkt werden konnte.

Vor einigen Jahren wurde weiter gefunden, daß das Vorliegen von dysplastischen Läsionen und Zervixkarzinomen mit dem Nachweis von Zervixkarzinom-assoziierten humanen Papillomviren, z. B. HPV 16 oder HPV 18, korreliert. Als Nachweis für prä-maligne oder maligne Zervixerkrankungen ist auch der Nachweis von Antikörpern gegen die viralen HPV Onkoproteine E6 und E7 im Serum von Patienten mittels ELISA oder vergleichbaren Methoden möglich. Diskutiert wird auch, daß bestimmte chromosomale Deletionen mit einem erhöhten Risiko zu maligner Transformation der entsprechenden Präkanzerose assoziiert sind. Ebenso korrelieren morphologische Veränderungen von Zellen und Zellkernen mit maligner Progression. Diese Veränderungen können zytometrisch erfaßt werden.

Dennoch ist es weder durch den "Pap-Test" noch durch den Nachweis onkogener HPV-Typen möglich, eine Prognose über die Weiterentwicklung einzelner Läsionen zu geben. Dies gilt auch für den Nachweis HPV-spezifischer Antikörper im Serum von Patienten. Vielmehr ist es mit diesem serologischen Verfahren nur möglich, Patienten zu erfassen, bei denen bereits ein Karzinom vorliegt. Das Antikörper-Nachweis Verfahren kann daher nicht als Ergänzung zur derzeitigen Vorsorge gesehen werden, sondern nur zur Manifestierung des Befundes, daß sich bereits ein Karzinom entwickelt hat. Des weiteren haben die genetischen Analysen und zytometrischen Ansätze den Nachteil, daß sie technisch sehr aufwendig sind und daher in der Routine-Diagnostik keinen Stellenwert erreicht haben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem das Progressionspotential von Zervixläsionen zuverlässig abgeschätzt werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die sich zur Abschätzung des Progressionspotentials von Zervixläsionen eignet. Eine solche Nukleinsäure kann durch übliche Verfahren bereitgestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem man RNA von frühen und späten Passagen HPV-immortalisierter Zellen isoliert und von dieser RNA jene identifiziert und als DNA oder RNA bereitstellt, die für die frühen bzw. die späten Passagen charakteristisch ist bzw. in deutlich unterschiedlichen Mengen exprimiert ist.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß späte Passagen von HPV-immortalisierten Zellen in Nacktmäusen Tumoren hervorrufen, während frühe Passagen solcher Zellen hierzu nicht in der Lage sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß in späten Passagen HPV-immortalisierter Zellen bestimmte RNAs stärker nachweisbar sind, als dies in frühen Passagen solcher Zellen der Fall ist.

Zur Bereitstellung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kann RNA von frühen und späten Passagen HPV-immortalisierter Zellen isoliert werden. Frühe Passagen sind z. B. Passagen 20–60, und späte Passagen z. B. ab 130. Als Zellen können z. B. HPV 16-immortalisierte, humane Vorhautkeratinozyten, HPK-1A-Zellen, verwendet werden (vgl. Dürst, M. et al, Oncogene 1/3, (1987), 251–256). Die RNA der frühen und späten Passagen kann miteinander verglichen werden, wodurch Unterschiede ermittelt werden, die für die frühen bzw. späten Passagen charakteristisch sind. Hierzu ist es günstig, die RNA einer reversen Transkription zu unterziehen. Dabei ist es vorteilhaft, sog. Verankerungsprimer zu verwenden, d. h. oligo-d(T)-Primer, die am 3'-Ende auf eine Folge von 11–15 Thymidin-Basen noch zwei andere Basen aufweisen, und somit gezielt den Übergang vom 3'-Ende einer mRNA in den Poly(A)-Schwanz erkennen und dort binden. Die erhaltene cDNA kann einer Amplifikation in einem PCR-Verfahren unterzogen werden. Hierfür ist es günstig, übliche "Arbitrary"-Primer, zusammen mit vorstehenden Verankerungsprimern zu verwenden. Die amplifizierte cDNA kann dann einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen werden. In diesem Schritt werden cDNA-Banden identifiziert, die eine unterschiedliche Intensität in den miteinander zu vergleichenden cDNA-Proben, d. h. RNA-Isolaten aus den frühen und späten Passagen HPV-immortalisierter Zellen, aufweisen. Diese cDNA-Banden können aus dem Gel isoliert und einer weiteren vorstehenden Amplifikation unterzogen werden. Ferner können sie kloniert und in ihrer Sequenz bestimmt werden. Vorstehende Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Ergänzend wird auf die folgende Literatur verwiesen (vgl. Liang et al, Cancer Research 52, (1992), 6966–6968; Liang et al, Science 257, (1992), 967–971; Liang et al, Nucleic Acids Research 21, (1993), 3269–3275).

Eine vorstehende (c)DNA stellt eine erfindungsgemäße Nukleinsäure dar. Letztere ist auch eine entsprechende RNA, wobei eine (c)DNA bevorzugt wird. Ganz besonders bevorzugt wird eine (c)DNA, welche die Basensequenz von Fig. 1 oder Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche Sequenz umfaßt. Die (c)DNA von Fig. 1 wurde als C4,8 bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) unter DSM 11197 am 04. Oktober 1996 hinterlegt. Ferner wurde die (c)DNA von Fig. 2 als C21,7 bei der DSMZ unter DSM 11198 am 04. Oktober 1996 hinterlegt. Nachstehend wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure beispielhaft als DNA beschrieben.

Eine erfindungsgemäße DNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z. B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pQE-8 und pet3d. Für die Expression in Hefe sind z. B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z. B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, SG 13009 und BL21, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Polypeptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionspolypeptids exprimiert werden kann.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Polypeptid zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Polypeptid, das auch ein Fusionspolypeptid sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Vorzugsweise umfaßt ein vorstehendes Polypeptid die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Sequenz.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Polypeptid bzw. Fusionspolypeptid gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polykonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)polypeptid zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)polypeptid erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, das Progressionspotential von Zervixläsionen zuverlässig abzuschätzen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann in Zervixabstrichen festgestellt werden, ob diese Polypeptide enthalten, die für frühe oder späte Passagen HPV-immortalisierter Zellen charakteristisch sind. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid ein gegen das im Körper vorliegende Polypeptid gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, in Zervixabstrichen festgestellt werden, ob hier RNA vorliegt, die für frühe oder späte Passagen HPV-immortalisierter Zellen charakteristisch ist. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen. Mit der vorliegenden Erfindung ist es somit möglich, frühzeitig eine Aussage zu machen, ob sich ein Zervixkarzinom im Entstehen befindet.

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen gegen das Entstehen eines Zervixkarzinoms zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann ein Polypeptid inhibiert werden, das für späte Passagen HPV-immortalisierter Zellen charakteristisch ist. Auch kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, zur Inhibierung eines solchen Polypeptids genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z. B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung des für das Polypeptid kodierenden Gens verwendet.

Zur Durchführung der vorliegenden Erfindung, insbesondere hinsichtlich des diagnostischen Aspekts, wird weiterhin ein Kit bereitgestellt. Dieser enthält ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren, Polypeptide und/oder Antikörper. Insbesondere umfaßt er solche Nukleinsäuren und/oder Polypeptide, die vorstehend als bevorzugt genannt sind. Ferner enthält der Kit übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen. Der Kit ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die Basensequenz der erfindungsgemäßen (c)DNA C4,8. Ferner ist die Aminosäuresequenz des durch die (c)DNA C4,8 codierten Polypeptids angegeben.

Fig. 2 zeigt die Basensequenz der erfindungsgemäßen (c)DNA C21,7.

M bedeutet mol/l

BEISPIEL 1

Herstellung von erfindungsgemäßen cDNAs, C4,8 und C21,7

Aus frühen Passagen, d. h. Passage p49, und späten Passagen, d. h. Passage p359 und p389, der HPV-immortalisierten Zelllinie HPK-1A (vgl. vorstehend), wurde jeweils Gesamt-RNA durch das bekannte Guanidin-Thiocyanat (GTC)-Verfahren isoliert. Die Gesamt-RNA wurde einer üblichen DNase-Reaktion unterzogen, wobei die RQ1-RNase-freie DNase von PROMEGA verwendet wurde.

Die erhaltene DNase-freie Gesamt-RNA wurde einem reversen Transkriptions-Verfahren unterworfen, wobei als Primer sog. Verankerungsprimer verwendet wurden. Diese Primer weisen am 3'-Ende auf eine Folge von 11–15 Thymidin-Basen noch zwei andere Basen auf, z. B. AA, AC, AG, CA, CC, CG, GA, GC, GG, AT, CT, GT, wodurch die Bindung der Primer direkt am Übergang der mRNA auf den Poly(A)-Schwanz erfolgt.

Die Bedingungen für die reverse Transkription waren wie folgt:

	RNasin 20 u/μl	1,0 μl
	dNTP-Mix (2,5 mM)	1,2 μl
	MMLV Reverse Transkriptase 300 u/μl	2,5 μl
	0,1 M DTT	5,0 μl
5	Gesamt-RNA 250 ng/μl	5,0 μl
	T ₁₂ VV-Primer (V = A, C oder G), 25 μM	5,0 μl
	5 × RT-Puffer*)	10,0 μl
	dH ₂ O	<u>20,3 μl</u>
10		50,0 μl

*) 5 × RT-Puffer:
 250 mM Tris-HCl (pH 7,6)
 375 mM KCl
 15 mM MgCl₂.

Die Gesamt-RNA wurde vor der Reaktion 5 Minuten bei 70–80°C denaturiert, dann auf Eis abgeschreckt und im Reaktionsgefäß vorgelegt. Alle restlichen Komponenten wurden bei 0°C gemischt und zur Gesamt-RNA gegeben, zuletzt wurde alles mit Mineralöl überschichtet und 45–60 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms bei 95°C (5 Minuten) gestoppt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die RT-Ansätze bei –20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

Die erhaltene cDNA wurde einem PCR-Verfahren unterworfen. Hierzu wurden 20 μl-Ansätze gemacht, die jeweils 2 μl des vorstehenden reverse Transkriptionsansatzes als Template (1/10 des Reaktionsvolumens, entsprechend dem Äquivalent von 25–50 ng cDNA/PCR-Ansatz) aufwiesen. Die restlichen Komponenten (vg. nachstehend) wurden als "Master-Mix" angesetzt und anschließend zugegeben. Ein PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

	RT-Ansatz (vorgelegt)	2,0 μl
	Mix:	
30	10 × PCR-Puffer*)	2,0 μl
	10-mer Arbitrary-Primer 5 μM	2,0 μl
	T ₁₂ VV-Primer (V = A, C oder G), 25 μM	2,0 μl
	dNTP-Mix (2,5 mM gesamt)	0,4 μl
35	50 mM MgCl ₂	0,7 μl
	Taq-DNA-Polymerase 20 U/μl	0,2 μl
	α- ³² P-dCTP	0,1 μl
	dH ₂ O	<u>10,6 μl</u>
40		20,0 μl

*) 10 × PCR-Puffer:
 200 mM Tris-HCl (pH 8,55)
 160 mM (NH₄)₂SO₄
 45 Magnesium: optimale Konzentration wird mit 50 mM MgCl₂ eingestellt.

Der 10-mer Arbitrary-Primer ist z. B. "AGC CAG CGA A" (AP-1) oder "GCA ATC GAT G" (AP-6). Die Reaktion wurde im DNA-Thermocycler (Perkin-Elmer Gen-Amp 9600) mit folgenden Programmschritten durchgeführt:

	Programm 1:	Denaturierung	95 °C, 3 Minuten	1 Zyklus
55	Programm 2:	Denaturierung	95 °C, 15 Sekunden	max. 30 Zyklen
		Primer-Annealing	40 °C, 2 Minuten	
		Primer-Extension	72 °C, 30 Sekunden	
60	Programm 3:	Primer-Extension	72 °C, 5 Minuten	1 Zyklus

Nach Beendigung des PCR-Verfahrens wurden die Ansätze auf ein denaturierendes, 4,5–6% Polycrylamidgel aufgetragen. Durch Vergleich der cDNA-Banden aus den frühen und späten Passagen der HPK-IA-Zellen konnten diejenigen identifiziert werden, die unterschiedlich waren, d. h. in den späten Passagen viel stärker vertreten waren als in den frühen.

Diese cDNA-Banden wurden für eine weitere Amplifikation verwendet. Hierzu wurden sie aus dem Polyacrylamidgel herausgeschnitten und in ein weiteres PCR-Verfahren eingebracht. Der PCR-Ansatz setzte sich wie

folgt zusammen:

10 x PCR-Puffer	5,0 µl	
10-mer Arbitrary-Primer 5 µM	5,0 µl	
T ₁₂ VV-Primer (V = A, C oder G), 25 µM	5,0 µl	5
dNTP-Mix (2,5 mM gesamt)	1,2 µl	
50 mM MgCl ₂	1,5 µl	
Taq-DNA-Polymerase 20 U/µl	1,0 µl	
dH ₂ O	31,5 µl	10
	50,0 µl	

Die PCR-Reaktion wurde unter den gleichen Bedingungen und mit derselben Abfolge von Programmen wie die erste PCR-Reaktion durchgeführt.

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Ansätze auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt, und die gewünschten DNA-Banden aus dem Gel herausgeschnitten. Anschließend wurden die DNA-Banden aus den Agarose-Stückchen eluiert, wobei sog. "GenElute"-Säulchen (SUPELCO) verwendet wurden.

Die erhaltene cDNA wurde in dem Klonierungsvektor pCRII unter Verwendung des "TA-Kloning-Kit" (INVITROGEN) kloniert. Erhaltene Klone wurden mittels des "T7-Sequencing-Kit" (PHARMACIA) in ihrer Sequenz bestimmt. Es wurden die erfindungsgemäßen cDNAs, C4,8 und C21,7 erhalten.

Beispiel 2

Vergleichsstudien unter Verwendung der erfindungsgemäßen cDNAs C4,8 und C21,7

a) Die gemäß Beispiel 1 isolierte Gesamt-RNA aus frühen und späten Passagen von HPK-IA Zellen wurde einer denaturierenden 4,5–6% Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen. Anschließend wurde ein üblicher Northern-Blot durchgeführt, wobei die RNA auf "Gene Screen-Plus"-Nylonmembranen transferierte wurde. Zur Hybridisierung wurden erfindungsgemäße ³²P-markierte cDNAs, C4,8 und C21,7, verwendet.

Es zeigte sich, daß die erfindungsgemäßen cDNAs weit stärker mit der RNA aus den späten Passagen der HPK-IA-Zellen reagierten, als dies mit den frühen Passagen der Fall war.

b) Ferner wurden RNA-RNA-insitu Hybridisierungen an Gefrierschnitten von Zervixgewebe, nämlich normalem Epithelgewebe, präaligner Läsion und Karzinom, vorgenommen, um den Zustand des Gewebes abzuschätzen. Als Hybridisierungs sonden wurden RNA-Proben verwendet, die von den erfindungsgemäßen cDNAs C4,8 und C21,7 erhalten wurden. Dazu wurden letztere linearisiert und RNA wurde durch Zugabe der entsprechenden RNA-Polymerase, bevorzugt SP6 oder T7, und ³²P-rUTP synthetisiert. Die RNA-RNA in situ Hybridisierung mit dem vorstehenden Gewebe wurde unter stringenten Bedingungen durchgeführt, z. B. bei 60°C.

Es zeigte sich, daß nur beim Zervixkarzinom eine starke Hybridisierung erhalten wurde. Bei normalen Epithelgewebe war dagegen die Hybridisierung äußerst gering.

Die vorstehenden Daten unterstreichen, daß sich die vorliegende Erfindung bestens eignet, potentiell maligne Zellen in einem Zervixabstrich zu detektieren.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, geeignet zur Abschätzung des Progressionspotentials von Zervixläsionen, wobei die Nukleinsäure durch ein Verfahren erhältlich ist, bei dem man RNA aus frühen und späten Passagen HPV-immortalisierter Zellen isoliert und von dieser RNA jene identifiziert und als DNA oder RNA bereitstellt, die für die frühen bzw. späten Passagen charakteristisch ist.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure die Basensequenz von Fig. 1, wobei Fig. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist, oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche Sequenz umfaßt.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure die Basensequenz von Fig. 2, wobei Fig. 2 Bestandteil dieses Anspruchs ist, oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche Sequenz umfaßt.
4. Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die durch die Nukleinsäure nach Anspruch 1 codiert ist.
5. Polypeptid nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid die Aminosäuresequenz von Fig. 1, wobei Fig. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist, oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Sequenz umfaßt.
6. Verfahren zur Herstellung der Nukleinsäure nach Anspruch 1, bei dem man RNA aus frühen und späten Passagen HPV-immortalisierter Zellen isoliert und von dieser RNA jene identifiziert und als DNA oder RNA bereitstellt, die für die frühen bzw. späten Passagen charakteristisch ist.
7. Antikörper, gerichtet gegen das Polypeptid nach Anspruch 3 oder 4.
8. Verwendung der Nukleinsäure nach Anspruch 1 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie eines Zervixkarzinoms und zur Abschätzung des Progressionspotentials von Zervixläsionen.
9. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5 als Reagens zur Diagnose eines Zervixkarzinoms

und zur Abschätzung des Progressionspotentials von Zervixläsionen.

10. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 7 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie eines Zervixkarzinoms und zur Abschätzung des Progressionspotentials von Zervixläsionen.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 10 in Form eines Kits, umfassend ein oder mehrere Nukleinsäuren nach Anspruch 1, Polypeptide nach Anspruch 4 oder 5 und/oder Antikörper nach Anspruch 7 sowie übliche Hilfsstoffe.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

1 GCAATCGATGGGGCATCCTTTCTGAAGATCTTCGGGGCCACTGTCGTCAGTGCCATGCAG 60
-----+-----+-----+-----+-----+
CGTTAGCTACCCCGTAGGAAAGACTTCTAGAAGCCCGGTGACAGCAGGTCACGGTACGTC
a A I D G A S F L K I F G P L S S S A M Q -

61 TTGTCAACGTGGGCTACTTCCTCATCGCAGCCGGCGTTGTGGTCTTTGCTCTTGGTTTC 120
-----+-----+-----+-----+-----+
AAACAGTTGCACCCGATGAAGGAGTAGCGTCGGCCGCAACACCAGAAACGAGAACCAAAG
a F V N V G Y F L I A A G V V V F A L G F -

121 CTGGGCTGCTATGGTGCTAAGACTGAGAGCAAGTGTGCCCTCGTGACGTTCTTCTTCATC 180
-----+-----+-----+-----+-----+
GACCCGACGATACCACGATTCTGACTCTCGTTTACACGGGAGCACTGCAAGAAGAAGTAG
a L G C Y G A K T E S K C A L V T F F F I -

181 CTCCTCCTCATCTTCATTGCTGAGGTTGCAGCTGCTGTGGTCGCCTTGGTGTACACCATA 240
-----+-----+-----+-----+-----+
GAGGAGGAGTAGAAGTAACGACTCCAACGTCGACGACACCAGCGGAACCACATGTGGTAT
a L L L I F I A E V A A A V V A L V Y T I -

241 ATGGCTGAGCACTTCCCGACGTTGCTGGTAGTGCCTGCCATCAAGAAGATTATGGTT 297
-----+-----+-----+-----+-----+
TACCGACTCGTGAAGGGCTGCAACGACCATCACGGACGGTAGTTCTTCTAATAACCAA
a M A E H F P T L L V V P A I K K I M V -

Fig. 1

```

1  AGCCAGCGAA CGGACGAGGG TGACAATAGA GTGTGGTGTC ATGCTTGTGA
51 GAGAGAAAAC ACTTTCGAGT GCCAGAACCC AAGGAGGTGC AAATGGACAG
101 AGCCATACTG CGTTATAGCG GCCGTGAAAA TATTTCACG TTTTTCATG
151 GTTGCGAACA GGTGCTCCGC TGGTTGTGCA GCGATGGAGA GACCCAAGCC
201 AGAGGAGAAG CGGTTTCTCC TGGAAGAGCC CATGCCCTTC TTTTACCTCA
251 AGTGTGTGTA A
    
```

Fig. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.